azti tecnalia

Transforming Science into Business

www.azti.es

Revista de

Investigación Marina

[26.2]

Protocolos para evaluar procesos y parámetros biológicos del mejillón

Izaskun Zorita
Leire Arantzamendi
Unai Aldalur
Manuel González
Ainhoa Juez
Inma Martín
José Germán Rodríguez
Naiara Serrano
Oihana Solaun

Izaskun Zorita, Leire Arantzamendi, Unai Aldalur, Manuel González, Ainhoa Juez, Inma Martín, José Germán Rodríguez, Naiara Serrano, Oihana Solaun 2019. Protocolos para evaluar procesos y parámetros biológicos del mejillón. Revista de Investigación Marina, AZTI, 26(2): 14-31

La serie *'Revista de Investigación Marina'*, editada por la Unidad de Investigación Marina de AZTI, cuenta con el siguiente Comité Editorial:

Editor: Javier Franco

Adjuntos al Editor: Edorta Aranguena e Irantzu Zubiaur

Comité Editorial: Haritz Arrizabalaga
Oihane C. Basurko
Ángel Borja
Guillem Chust
Almudena Fontán
Ibon Galparsoro
Arantza Murillas

La '*Revista de Investigación Marina'* de AZTI edita y publica investigaciones y datos originales resultado de la Unidad de Investigación Marina de AZTI. Las propuestas de publicación deben ser enviadas al siguiente correo electrónico jafranco@azti.es. Un comité de selección revisará las propuestas y sugerirá los cambios pertinentes antes de su aceptación definitiva.

Edición: 2.ª Marzo 2019
© AZTI
ISSN: 1988-818X
Unidad de Investigación Marina
Internet: www.azti.es
Edita: Unidad de Investigación Marina de AZTI
Herrera Kaia, Portualdea
20110 Pasaia
Foto portada: Izaskun Zorita. Mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) en una cuerda de crecimiento. © AZTI

© AZTI 2019. **Distribución gratuita en formato PDF a través de la web: www.azti.es/RIM**

Protocolos para evaluar procesos y parámetros biológicos del mejillón

Izaskun Zorita[1*], Leire Arantzamendi[2], Unai Aldalur[1], Manuel González[1], Ainhoa Juez[1], Inma Martín[1], José Germán Rodríguez[1], Naiara Serrano[1], Oihana Solaun[1]

Resumen

El cultivo de mejillón (*Mytilus* spp.) es una actividad emergente en la costa vasca. Las experiencias de cultivo de mejillón llevadas a cabo mediante *long-lines* en Mendexa, en el tramo litoral Ondarroa-Lekeitio (Sureste del golfo de Vizcaya) ofrecen expectativas favorables para su desarrollo. Sin embargo, aún no se conocen bien algunos aspectos básicos de su biología en condiciones de mar abierto y son de suma relevancia para desarrollar un sector acuícola en el País Vasco. El presente trabajo recoge protocolos para evaluar el ciclo reproductivo, el patrón de asentamiento y reclutamiento, el índice de condición y el rendimiento de vianda/carne de mejillón. Estos protocolos se presentan en detalle y con abundantes ilustraciones y se ponen a disposición del sector y del público en general. La información que se obtiene a partir de la aplicación de estos protocolos es útil para establecer periodos de puesta, determinar la capacidad de captación de semilla utilizando cuerdas colectoras e identificar los periodos óptimos para la cosecha del mejillón. Todos ellos son aspectos importantes para la producción y comercialización de este producto. Aunque una de las motivaciones de la publicación de estos protocolos es contribuir al desarrollo del cultivo de mejillón en la costa vasca, son de aplicación en cualquier otra zona.

Palabras clave: Mejillón, *Mytilus* spp., Asentamiento y reclutamiento de semilla, Desarrollo gametogénico, Rendimiento de vianda, Índice de condición, Acuicultura

Abstract

Mussel farming is an emerging activity in the Basque coast. The experiences of mussel (*Mytilus* spp.) culture carried out in long-lines in the coastal zone of Mendexa, between Ondarroa and Lekeitio (Southeastern Bay of Biscay), have been promising. However, some basic aspects of the biology of mussels cultured in offshore conditions are not yet well understood and are highly relevant for the development of an aquaculture sector in the Basque Country. The present work gathers protocols for the evaluation of the reproductive cycle, larval settlement and recruitment patterns, condition index and mussel flesh/meat yield. These protocols are shown in detail and profusely illustrated and are made available to the aquaculture sector and the general public. The information obtained through the application of these protocols will be useful to establish spawning periods, to determine the capacity for mussel seed gathering using collector ropes and to identify optimum periods for harvesting. All these are relevant issues for mussel production and commercialization. These protocols may contribute to the development of mussel farming in the Basque coast; moreover, they can be applied in any other zones where mussel culture can take place.

Keywords: Mussel, *Mytilus* spp., Larval settlement and recruitment, Gamete development, Flesh yield, Condition index, Aquaculture

[1] *AZTI; Marine Research Division; Herrera Kaia, Portualdea z/g; 20110 Pasaia; Gipuzkoa, Spain*
[2] *AZTI; Marine Research Division; Txatxarramendi Ugartea z/g, 48395-Sukarrieta, Spain*
[*] *corresponding author: izorita@azti.es*

Introducción general

En el País Vasco, a pesar de que el litoral presenta importantes condicionantes en cuanto a competencia de usos y características océano-meteorológicas para la acuicultura en mar abierto, el fuerte arraigo cultural de los sectores marítimo y pesquero refuerza el interés y las posibilidades de desarrollar actividades productivas en el mar que puedan realizarse de una manera sostenible y con rendimiento económico (Gobierno Vasco, 2014). En este sentido, las actividades de acuicultura de moluscos en mar abierto se han considerado en los Planes de Pesca y Acuicultura del País Vasco (Gobierno Vasco, 2008, 2014) como oportunidad clara de diversificación económica para el sector pesquero. En el tramo litoral entre Lekeitio y Ondarroa, AZTI posee una planta piloto en mar abierto (Mendexa), para llevar a cabo I + D + i en acuicultura, en la que cuenta con un *long-line* instalado mediante un sistema de anclajes y boyas sobre fondos de 50 m del cual cuelgan cuerdas de cultivo de mejillón. Más específicamente, este tramo litoral se considera zona de interés estratégico para la producción de acuicultura en mar abierto en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) y fue declarada zona de producción de moluscos bivalvos (ZPM) (Orden de 8 de enero de 2016, BOPV Nº19, del 15 de enero de 2016). Dicha decisión se basó en los resultados obtenidos en varios estudios técnicos, medioambientales y económicos llevados a cabo por AZTI desde 2010 (Mendiola *et al.,* 2011a,b, 2012, 2015, González *et al.,* 2017), en los que se concluyó que en dicho tramo se dan las condiciones adecuadas para el desarrollo de la actividad de producción de moluscos bivalvos.

Sin embargo, aún no se conocen bien algunos aspectos básicos de la biología del mejillón en condiciones de mar abierto que son de suma relevancia para desarrollar un sector acuícola en la CAPV. Por ello, el objetivo de este trabajo es recopilar, adaptar protocolos existentes (desarrollados por otros autores o asociaciones de mejilloneros) y presentarlos de forma clara y sencilla para que resulten útiles y estén disponibles para investigadores, para el público en general y para el sector acuícola. Este trabajo recoge protocolos para evaluar el ciclo reproductivo, el patrón de asentamiento y reclutamiento de semilla de mejillón, el índice de condición y el rendimiento de vianda de mejillón. La información que se obtiene a través de la aplicación de estos protocolos será útil para establecer periodos de puesta, determinar la capacidad de captar semilla utilizando colectores, identificar los periodos óptimos para la comercialización de mejillones y ayudar a definir su precio en el mercado. Con la publicación de estos protocolos se pretende contribuir al desarrollo del cultivo de mejillón en la costa vasca, así como a facilitar este tipo de estudios en otras zonas.

Evaluación del desarrollo gametogénico del mejillón

Contexto

El ciclo reproductivo en bivalvos está controlado por factores exógenos como la temperatura y la disponibilidad de alimento (Bayne, 1976). Por ello, se pueden encontrar diferencias significativas en el patrón temporal de la condición de las gónadas de bivalvos de orígenes diferentes en función de la adaptación al medio (da Silva *et al*., 2009; Mondol *et al*., 2016). En ocasiones también puede haber variaciones anuales en el ciclo reproductivo dentro de una misma población (Azpeitia *et al.,* 2017). En general, el desarrollo gonadal de mejillones del género *Mytilus* empieza en invierno y primavera, cuando la temperatura del agua y la disponibilidad de alimento aumentan, y la puesta ocurre a finales de primavera (Gosling, 2004; Beyer *et al.,* 2017). Dependiendo del estado de desarrollo de los gametos, éstos pueden representar entre el 20 y el 50% del peso total de los bivalvos (Sprung, 1991; Choi *et al*., 1993). Los cambios en la proporción relativa de la gónada respecto al tejido somático se relacionan con el periodo de puesta, por lo que este afecta significativamente a la condición óptima para la comercialización. Por ello, es importante caracterizar el ciclo reproductivo de los mejillones, tanto para determinar la época óptima para vender la carne de mayor calidad como para estimar los periodos de captación de semilla de poblaciones naturales. El método más fiable para determinar el ciclo reproductivo en mejillones es el que se basa en preparaciones histológicas del manto/gónada.

Material

- Pinzas de disección
- Bisturí
- Tijeras de disección
- Guantes de nitrilo
- Casetes para histología
- Moldes de plástico o de acero inoxidable
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Baño de parafina
- Dispensador de parafina
- Cubetas o equipo de tinción automático
- Cubetas o baño de deshidratación
- Microtomo
- Placa de hielo
- Papel secante
- Bandeja plana
- Pipeta Pasteur
- Recipientes de plástico de 2 l
- Caja de poliespán o nevera
- Balanza
- Pincel
- Nevera portátil
- Refrigerador
- Estufa
- Microscopio fotónico

Reactivos y soluciones

- Agua destilada (dH2O)
- Metilbenzoato
- Benceno
- Xilol
- Hematoxilina
- Eosina
- Clara de huevo
- Cristales de timol
- Parafina
- Medio de montaje para histología (DPX)

Formalina tamponada al 4%, pH 7,2: mezclar 900 ml de agua de mar con 100 ml de formaldehído (CH_2O) al 37% o, si se prefiere, mezclar 900 ml de agua destilada (dH_2O) con 28,92 g de disodio fosfato dodecahidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$) y 2,56 g de sodio hidrógeno fosfato monohidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) más 100 ml de formaldehído al 37%.

Alcohol ácido al 0,25%: añadir 0,25 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 37% a 100 ml de alcohol (C_2H_5OH) al 70%.

Carbonato de litio: añadir carbonato de litio (Li_2CO_3) en dH_2O hasta saturación. El nivel de saturación suele ser de 1,3 g de carbonato de litio por cada 100 ml de dH_2O.

Albúmina: mezclar a partes iguales glicerina, dH_2O y clara de huevo. Filtrar la mezcla con papel de filtro y añadir cristales de timol para prevenir la aparición de moho.

Alcoholes de diferente graduación: 70%, 96%, 100%.

Obtención de muestras

Para evaluar el ciclo reproductivo del mejillón se recogen entre 10 y 20 individuos. Cuanto mayor sea la frecuencia de muestreo, mejor se podrá establecer el ciclo de desarrollo gametogénico. Una frecuencia mensual se considera adecuada. Se recomienda realizar la disección en el mismo lugar de muestreo (Blanco-Rayón, 2018) pero, si no es posible, los mejillones se deben transportar al laboratorio en una bolsa etiquetada dentro de una nevera y procesar las muestras a la mayor brevedad posible.

Procedimiento

Disección: Se colocan los mejillones sobre una bandeja recubierta con papel secante. Para abrir el mejillón se introduce un bisturí a través de las dos valvas para cortar el músculo abductor. Una vez que el ligamento se ha cortado y se ha abierto el mejillón, se selecciona y se disecciona una porción de gónada y/o manto puesto que en el manto también aparecen células germinales (Figura 1). Es recomendable que la porción no sea superior a 5 mm^3. A continuación, se introduce el tejido en un casete previamente etiquetado.

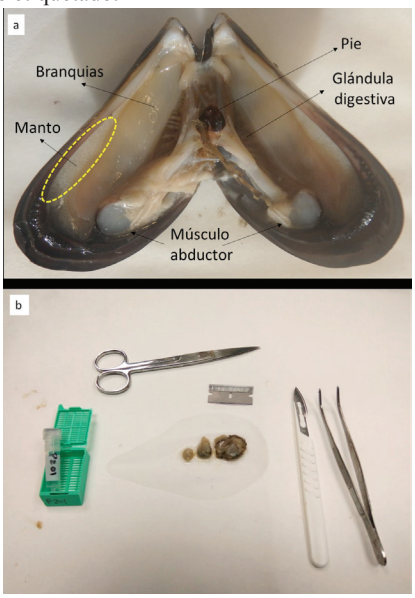

Figura 1 (a). Mejillón abierto mostrando su anatomía y (b) tejido diseccionado listo para ser introducido en un casete de histología.

Fijación: Los casetes con las muestras recién diseccionadas se introducen en un bote o recipiente de 2 l con formalina tamponada al 4% durante 24 h a 4°C. Es recomendable que el volumen del fijador sea 5 veces el volumen de la muestra para que la fijación se produzca en buenas condiciones. Si el procesado histológico no se puede llevar a cabo tras las 24 h – 48 h, las muestras se deben transferir a un bote con alcohol al 70% a temperatura ambiente hasta su procesado.

Deshidratación de las muestras: Las muestras se van transfiriendo en una serie de alcoholes de menor a mayor graduación (Tabla 1). Este proceso se puede hacer manualmente o se puede utilizar un baño de deshidratación automático.

Tabla 1. Proceso de deshidratación de tejidos.

Paso	Compuesto	Tiempo
1	Alcohol 70%	45 min.
2	Alcohol 96%	45 min.
3	Alcohol 100%	45 min.
4	Alcohol 100%	45 min.
5	Metilbenzoato	Desde 8 h hasta meses.
6	Benceno	45 min.
7	Benceno	45 min.

Inclusión en parafina: Incluir las muestras en un baño de parafina durante 4 h a 56°C. Posteriormente, se extrae la muestra de los casetes y se pone en un molde de plástico o acero inoxidable. A continuación, se procede a rellenar de parafina fundida el molde con la muestra, se coloca en la parte superior del molde el casete que contiene la etiqueta de la muestra y se traslada a una placa fría para que la parafina se endurezca. Tras 1-2 h se puede retirar el molde y el bloque de parafina que contiene la muestra se puede almacenar a temperatura ambiente.

Corte de tejido: Los bloques de parafina se cortan con un microtomo a 7 µm de grosor. Para que el corte se realice más fácilmente se pueden colocar los bloques de parafina sobre una placa de hielo, que hará que la parafina se endurezca. Tras realizar los cortes, las secciones se colocan en la superficie de un baño con agua destilada a temperatura de 45-50°C y se dejan expandir. A continuación, se desliza un portaobjetos previamente frotado con albúmina de huevo sobre una de las secciones para que la muestra se pegue al cristal (Figura 2). Se dejan secar los portaobjetos con las muestras en una estufa a 37°C durante 24 h. Se almacenan a temperatura ambiente hasta su tinción.

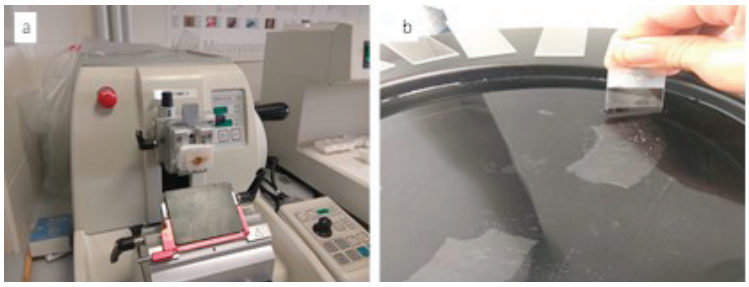

Figura 2. Corte de tejido. (a) Microtomo con un bloque de parafina con la muestra de mejillón y (b) inmersión de un portaobjetos previamente frotado con albúmina en un baño para adherir la sección al cristal.

Tinción: Los cortes histológicos se tiñen con hematoxilina-eosina (Tabla 2). La tinción se puede realizar manualmente o programando un equipo de tinción automático. Para ello, se introducen los portaobjetos con las secciones en una serie de soluciones diferentes que consisten en desparafinar la muestra, hidratarla, teñirla y deshidratarla. La tinción de hematoxilina-eosina es una tinción topográfica que permite discriminar orgánulos en función del pH del medio. Así, los núcleos de las células (ácidos) se teñirán de color morado (hematoxilina básica) y el citoplasma (básico) se teñirá de color rosado (eosina ácida).

Tabla 2. Tinción de hematoxilina-eosina.

Paso	Compuesto	Tiempo
1	Xilol	10 min.
2	Xilol	10 min.
3	Alcohol 100%	2 min.
4	Alcohol 100%	2 min.
5	Alcohol 96%	2 min.
6	Alcohol 70%	2 min.
7	dH_2O	5 min.
8	Hematoxilina	4 min.
9	dH_2O	2 min.
10	dH_2O	10 s.
11	dH_2O	10 s.
12	Alcohol ácido	10 s.
13	dH_2O	5 min.
14	Carbonato de litio	10 s.
15	dH_2O	1 min.
16	Alcohol 70%	3 min.
17	Alcohol 80%	1 min.
18	Eosina	1 min.
19	Alcohol 96%	2 min.
20	Alcohol 96%	2 min.
21	Alcohol 100%	2 min.
22	Alcohol 100%	2 min.
23	Xilol	2 min.
24	Xilol	2 min.

Montaje: Se colocan unas gotas de medio de montaje para histología (DPX) en los cuatro extremos del portaobjetos con la ayuda de una pipeta Pasteur. A continuación, se coloca el cubreobjetos con la ayuda de unas pinzas e inclinando el portaobjetos se eliminan las burbujas entre el tejido y el cubreobjetos.

Observación de tejidos y evaluación del desarrollo gametogénico: Las preparaciones histológicas de gónada y/o manto se examinan individualmente bajo el microscopio.

Asignación de las fases de desarrollo gametogénico e índice gonadal

Las fases de desarrollo gametogénico de cada mejillón se asignan en función de la madurez de los folículos y gametos y se identifican siguiendo el criterio adaptado de Seed (1969) (Figura 3, Tabla 3). Posteriormente, se asigna un valor numérico al índice gonadal (Cajaraville *et al.,* 1992) (Tabla 3). El cálculo de la proporción sexual se determina como Nº de hembras/Nº machos.

Tabla 3. Fases del estado reproductivo del mejillón modificado de Seed, (1969) y Cajaraville *et al*., (1992). GI: índice gonadal.

Fase gonadal	GI	Estado	Características
Fase I	0	Gónada en reposo	Sexualmente indiferenciado. Pocos o ningún gameto visible, tejido gonadal atrofiado. Incluye animales inmaduros o aquellos en los que ya se ha completado la puesta.
Fase II	1	Gónada en fase temprana de desarrollo gametogénico	La gónada está ocupada por fases tempranas de desarrollo (numerosos ovocitos pequeños unidos al epitelio germinal en hembras, y espermatogonias y espermatocitos en machos).
Fase III	2	Gónada en fase avanzada de desarrollo gametogénico	Los folículos empiezan a expandirse y a fusionarse a expensas de las reservas almacenadas en el tejido conectivo. Aproximadamente la mitad de cada folículo está ocupado por gametos maduros y la otra mitad por gónada en fase temprana de gametogénesis.
Fase IV	3	Gónada madura	La mayoría de los gametos son maduros, poco tejido conectivo restante. Los ovocitos se compactan haciendo una configuración poligonal mientras que en machos los folículos se distinguen con espermatozoides maduros.
Fase V	4	Gónada en puesta o desove	Los folículos gonadales aparecen parcialmente vacíos de gametos.
Fase VI	5	Gónada en post-puesta o desovada	Los folículos gonadales contienen algún gameto residual pero prácticamente están vacíos y comienzan a atrofiarse.

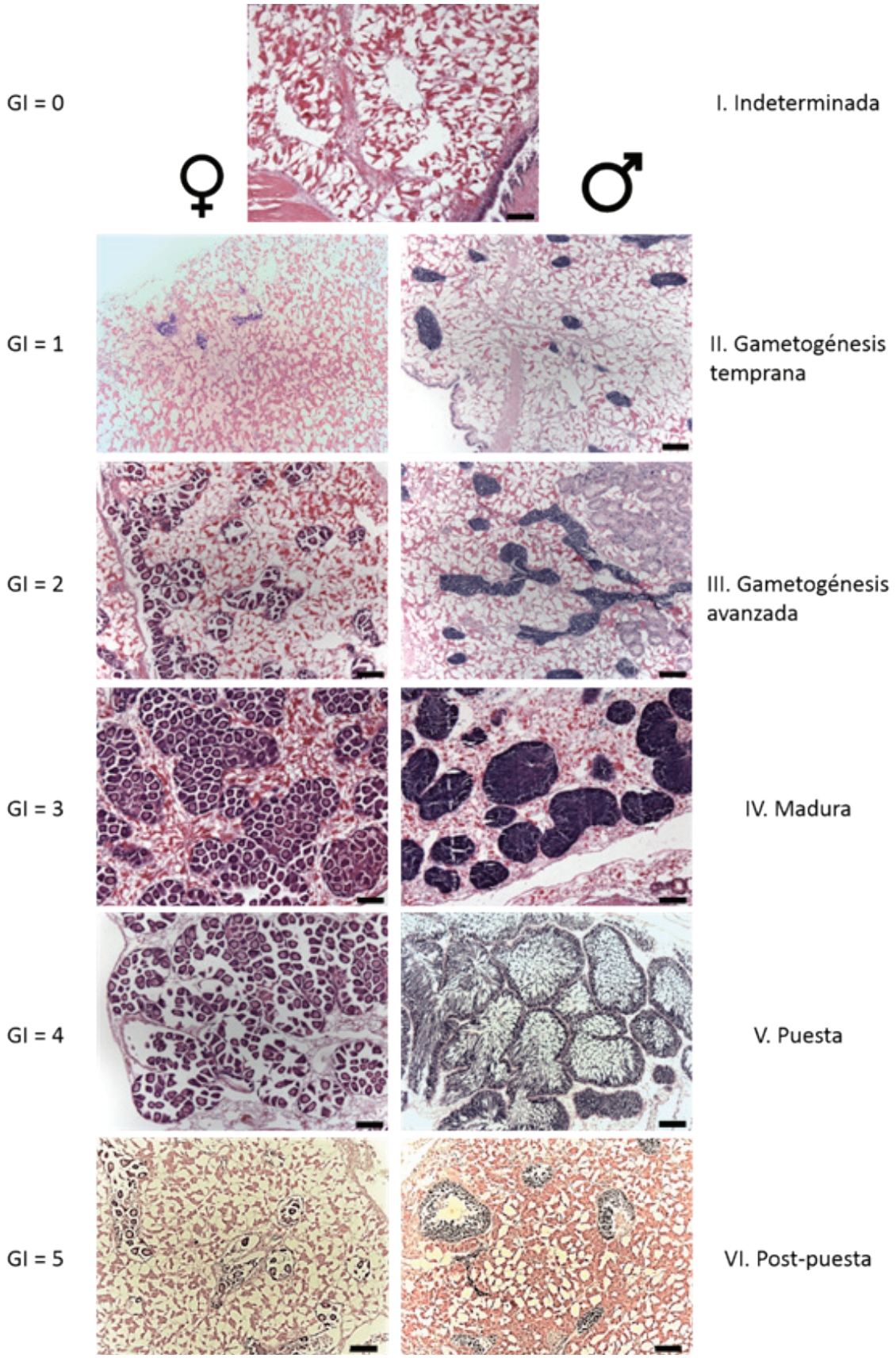

Figura 3. Micrografías de las fases de desarrollo gametogénico de mejillones hembras y machos teñidas con hematoxilina y eosina. Barra de escala: 100 µm.

Determinación del asentamiento y reclutamiento de semilla de mejillón

Contexto

El suministro de semilla de mejillón es crítico para su cultivo industrial (Fuentes y Morales, 1994). Los cultivos de mejillón de Galicia requieren, aproximadamente, 9.000 toneladas de semilla al año para mantener una producción anual de 250.000 toneladas (Pérez-Camacho *et al.*, 1995). El aprovisionamiento de semilla de mejillón procedente del medio natural puede llevarse a cabo de dos formas: una, por medio de cuerdas colectoras colocadas en bateas o en líneas de cultivo, en las cuales se van fijando las larvas de mejillón y, otra, la más extendida en Galicia, mediante su recolección en las rocas, empleando rascadores (Tirado y Macías, 2006). En Galicia, el 66% de la semilla se obtiene de las rocas, mientras que el 34% restante procede de cuerdas de captación (Pérez-Camacho y Labarta, 2004). Conocer los procesos de captación de semilla es de gran importancia para evaluar las diferentes opciones de aprovisionamiento de semilla para el cultivo del mejillón. El protocolo que se presenta a continuación es una modificación de los protocolos desarrollados por Filgueira *et al.,* (2007) y Peteiro *et al*. (2011) para estudios de captación de semilla de mejillón en las Rías gallegas.

Material

- Tamices con diferente luz de malla (150, 335, 670, 1.000 y 2.400 µm)
- Jarras agujereadas en el fondo con agujeros de 5, 10, 15 y 20 mm de diámetro
- Placas Petri de diferentes tamaños
- Pinzas de disección
- Cuchillo de sierra
- Tijeras
- Tabla de cortar
- Ictiómetro o regla de 30 cm
- Bandejas
- Contador
- Recipientes de 1l de vidrio/plástico
- Bolsas de plástico
- Papel secante
- Parafilm
- Etiquetas
- Rotuladores indelebles
- Estadillo
- Pulverizador de agua a presión
- Baño de ultrasonidos
- Botes de 50 ml de plástico
- Calibre
- Lupa binocular
- Congelador
- Cepillo

Soluciones

- Lejía (NaClO) diluida con agua corriente al 20%
- Agua

Obtención de muestras

El tipo de cuerdas colectoras empleadas, su número y las condiciones de su instalación (profundidad, longitud) dependerá de los objetivos del estudio. En este protocolo no se consideran estos aspectos y se parte de la recogida de las cuerdas. Las cuerdas colectoras de semilla de mejillón se extraerán con los medios que en cada caso sean necesarios; por ejemplo, en mar abierto hará falta probablemente una embarcación con grúa para facilitar el trabajo a bordo (Figura 4). A continuación, de cada cuerda se cortan 30 cm de la parte que ha estado a la profundidad seleccionada y se introducen en bolsas individuales de plástico etiquetadas. Posteriormente se transportan al laboratorio, donde se congelarán (-20ºC) hasta su procesado.

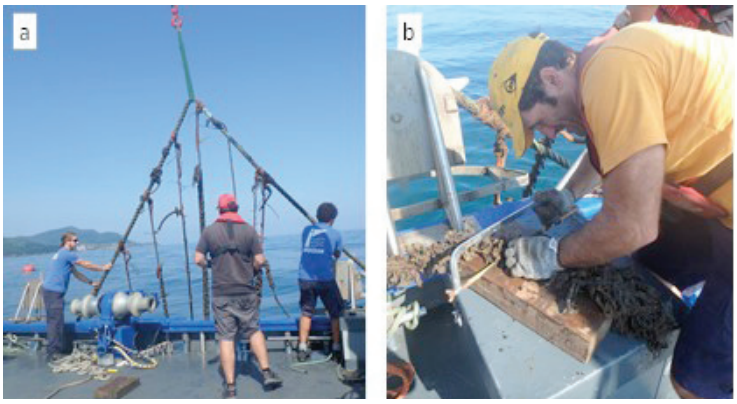

Figura 4 (a). Extracción de las cuerdas con la grúa y (b) corte de 30 cm de cuerda para ser analizada.

Procedimiento en el laboratorio

Descongelación y corte de la muestra: Se descongela la cuerda durante al menos 2 h y se corta una submuestra de 10 cm de longitud. El corte se realiza sobre un ictiómetro o sobre una regla, con precaución con el fin de que se despegue la menor cantidad de semilla posible.

Extracción de la semilla:

A) *Fase de asentamiento*

Si a primera vista, se estima que la semilla adherida a la cuerda es menor de 5 mm de longitud, la sección de 10 cm de cuerda se coloca en un vaso de precipitado de 1 l y se cubre con lejía al 20%. A continuación, el vaso se introduce en un baño de ultrasonidos durante 3 min (Figura 5). Por precaución es conveniente tapar el vaso de precipitado con una placa Petri o con Parafilm y, salir de la sala mientras se realiza la sonicación. No es recomendable que la cuerda permanezca demasiado tiempo en la lejía diluida, ya que puede digerir o estropear la muestra.

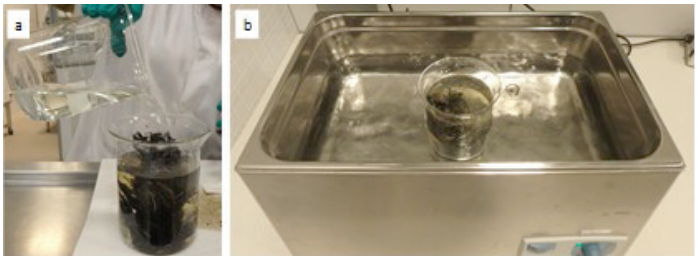

Figura 5. Extracción de semilla. (a) Cuerda cubriéndose con lejía al 20% y (b) cuerda sometida a un baño de ultrasonidos durante 3 min.

B) *Fase de reclutamiento*

Cuando el tamaño mayoritario de la semilla pegada a la cuerda supere los 5 mm de longitud, las semillas (reclutas) se desgranan de la cuerda a mano y se raspa la cuerda con un cuchillo o con un cepillo de cerdas blandas. Este proceso se debe hacer sobre una bandeja para recoger toda la semilla que se desprenda.

Clasificación por tallas:

A) *Fase de asentamiento* (150 µm y 2.400 µm).

Tras los 3 min de sonicación, se retira el recipiente del baño. Se saca la cuerda del vaso de precipitado y se traspasa a una bandeja, mientras el resto del contenido (que contiene lejía junto con semilla de mejillón suelta, restos de cuerda, incrustaciones biológicas, etc.) se vierte sobre una columna de tamices (Figura 6). La columna consiste en una serie de 5 tamices con diferentes tamaños de luz de malla: 150 µm < 335 µm <670 µm < 1.000 µm < 2.400 µm. Los tamices se superponen de manera que el tamiz de luz de malla más pequeño se coloca en la parte baja de la columna y el tamiz de luz de malla más grande en la parte superior. En la parte baja de la columna de filtrado se coloca una bandeja para recoger la lejía y que no se siga degradando la muestra. Así, todo el material sólido queda retenido en los diferentes tamices. A continuación, se raspa la cuerda con pinzas y se le aplica agua a presión con un pulverizador para despegar los individuos de mejillón que todavía están adheridos a la cuerda. Este proceso se realiza varias veces hasta que se consiga soltar todo el material adherido a la cuerda, que se recoge en la bandeja y se vierte de nuevo sobre la columna de tamices.

Así, en cada tamiz se separan mejillones de diferentes clases de talla junto con restos de cuerda, incrustaciones biológicas, etc. Para que no se colmaten los tamices, se recomienda agitar la columna y aplicar agua a presión mientras se vierte la muestra para limpiarla. Además, de forma manual o utilizando pinzas, se retiran de los tamices todos los restos que claramente no sean mejillón. Al final del proceso los mejillones más pequeños se quedan retenidos en la parte inferior de la columna de tamices, mientras que los más grandes se quedan en la parte superior, donde se sitúa el tamiz con una luz de malla mayor. El material que pasa por el tamiz de 150 µm se desecha por considerarse pequeño para la evaluación de semilla. A continuación, con la ayuda de un pulverizador con agua a presión o unas pinzas, se transfiere cuidadosamente la semilla retenida en cada malla a una placa de Petri etiquetada (Figura 6). Si el recuento de los mejillones no se puede realizar en los siguientes días, se recomienda guardar el contenido de cada placa en un bote cerrado a -20º C.

Figura 6. Clasificación por tallas. (a) Columna de filtrado compuesta por tamices de diferentes tamaños de luz de malla (150 µm < 355 µm <670 µm < 1.000 µm < 2.400 µm), (b) limpieza y raspado de la cuerda previamente sonicada en lejía diluida para extraer la semilla adherida a la cuerda, (c) retención de semilla de mejillón, incrustaciones biológicas y restos de cuerda en el tamiz de 670 µm, (d) transferencia de la semilla retenida en el tamiz mediante agua a presión a una placa Petri, (e) placas Petri con las semillas recogidas en cada tamiz.

Para determinar el rango o clase de talla de la semilla de mejillón retenida en cada tamiz, hace falta "calibrar" la columna de filtrado previamente. Para ello, se mide la longitud de concha (entendida como la máxima longitud a lo largo del eje anterior-posterior, con una precisión de 0,1 mm) de un número de individuos suficiente para que el coeficiente de variación sea menor del 10%, utilizando una lupa binocular en los estadios larvarios (150-2.400 µm) (Figura 7).

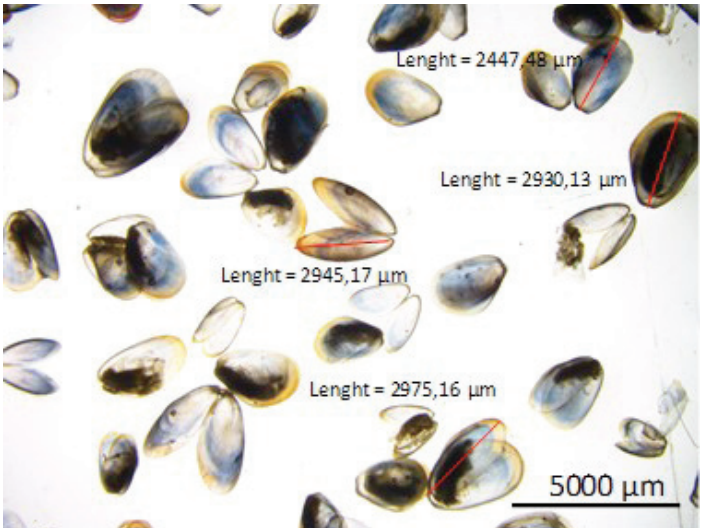

Figura 7. Medidas de longitud total de concha de semilla de mejillón realizadas con la lupa binocular.

Para este protocolo se midieron 400 individuos por tamiz y los rangos de clases de talla resultantes para la columna de tamices fueron los que aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4. Calibración de tamices mostrando el rango y el promedio de cada clase de talla que representa cada tamiz.

Tamiz (µm)	Rango (mm)	Promedio (mm)
335	0,5-1,1	0,7
670	0,9-1,8	1,2
1.000	1,3-4,8	2,8
2.400	2,7-8,4	5,3
5.000	5,4-15,4	9,5
10.000	8,9-18,6	13,4

B) Fase de reclutamiento (>5 mm)

Cuando la semilla de mejillón corresponde a la fase de reclutamiento (post-larvas >5 mm) la separación de la semilla por tamaños se realiza utilizando una columna compuesta por jarras agujereadas (Figura 8) que, de forma similar a los tamices, se encajan unas a otras de menor (abajo) a mayor tamaño (arriba). La muestra de mejillón vertida en la columna de jarras se va agitando (o lavando con agua si hace falta) para que pueda pasar de una jarra a otra y separarse por tallas. En la parte del fondo, cada jarra tiene agujeros de un diámetro definido, por lo que, al pasar la semilla por la columna de jarras, los reclutas quedarán distribuidos en 4 tamaños: 5 mm < 10 mm < 15 mm < 20 mm (de abajo-arriba en la columna). Al igual que en la columna de tamices, se debe realizar una calibración de la columna de jarras. Para ello, en este protocolo se midieron con un calibre 400 individuos retenidos en las jarras de 5 y 10 mm. El rango de tallas correspondiente a estas jarras aparece en la Tabla 4 (nótese que las jarras con agujeros de 15 y 20 mm de diámetro no se calibraron, ya que al retener pocos mejillones, se midieron los mejillones individualmente). Los mejillones retenidos en cada jarra se transfieren a un bote de 50 ml hasta su recuento.

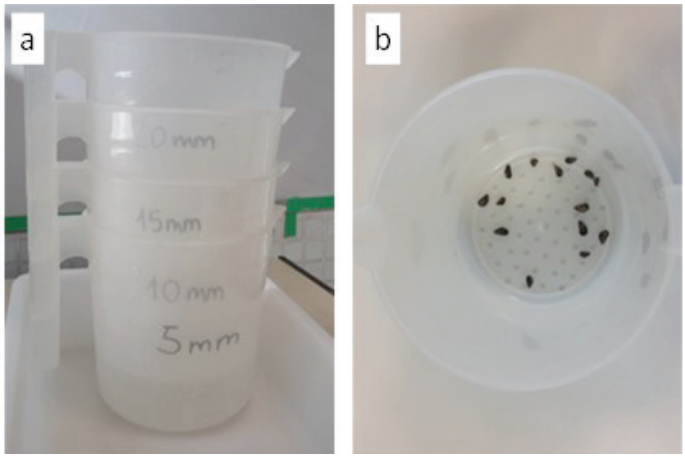

Figura 8. Clasificación por tallas. (a) Columna de filtrado compuesta por jarras con agujeros de diferentes diámetros (5 mm < 10 mm < 15 mm < 20 mm), (b) mejillones retenidos en una de las jarras.

Una vez que los tamices están calibrados, se cuentan todos los individuos de mejillón que hay en cada placa o en cada bote con la ayuda de un contador. Dependiendo del tamaño de la semilla de mejillón, el recuento se realiza bajo la lupa binocular o visualmente y se anota el número de individuos en cada clase de talla.

Cálculos y presentación de resultados

Recuento: Se realiza la suma de los individuos de cada placa (procedente de cada tamiz o jarra) para obtener el número total de individuos presentes en un tramo de cuerda de 10 cm.

Distribución por tallas: Se establece el porcentaje de individuos que están dentro de un rango de talla, tanto para la fase de asentamiento (l< 5 mm), como para la de reclutamiento (l> 5mm) (l, longitud total en el eje anterior-posterior). Con estos datos se puede inferir cuándo se produce la puesta, analizar el crecimiento (distribución de la frecuencia de clases de talla), estimar la mortalidad post-asentamiento y estimar la relación entre el asentamiento y el reclutamiento (Fuentes-Santos y Labarta, 2015), además de proporcionar información sobre en qué momento puede resultar más ventajosa la recolección de semilla (Tirado y Macías, 2006).

Densidad: Conociendo el número total de individuos y la longitud de cuerda muestreada se obtiene el dato de abundancia o densidad de semilla en la cuerda colectora (nº individuos / m de cuerda).

Talla ajustada: se calcula como:

$$L = \sum_{i=1}^{n} [(CLi\ X\ Fi)/N]$$

donde L es la talla ajustada de la muestra, n es el número de clases de talla (incluyendo tanto los tamices como las jarras), CLi es la talla media de la clase de talla i (valor medio del rango de la talla de esa clase), Fi es el número de individuos contados en la clase de talla i, N es el número total de individuos contabilizados (considerando todas las clases de talla) (Box *et al.,* 1989).

Coeficiente de mortalidad instantánea:

Dado que, en la práctica, la mortalidad y la emigración de la semilla no pueden ser valoradas separadamente, se utiliza el Coeficiente de mortalidad instantánea (Z) para evaluar la pérdida neta de individuos entre sucesivos muestreos. Dicha pérdida se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$N_m = N_{m-1} * e^{-zt}$$

donde N_m y N_{m-1} son el número de mejillones por muestra en un muestreo y en el muestreo anterior, respectivamente, y t es el tiempo transcurrido entre ambos expresado en días (Filgueira *et al*., 2007). De esta manera, el Coeficiente de mortalidad instantánea se calcula mediante la fórmula:

$$Z = 1/t * \ln (N_m/N_{m-1})$$

Índice de condición del mejillón

Contexto

El índice de condición da una idea de lo que supone la concha respecto al tejido vivo, en este caso de un mejillón. En el campo de la acuicultura los índices de condición tienen un doble interés: desde un punto de vista económico, el índice es un referente de la calidad comercial del producto; y desde el punto de vista ecofisiológico, el índice se emplea para caracterizar el aparente grado de salud del cultivo, al englobar la actividad fisiológica de los animales (crecimiento, reproducción, secreción, etc.), bajo determinadas condiciones ambientales (Lucas y Beninger, 1985). El índice de condición del mejillón presenta una estrecha relación con el ciclo reproductor, y los cambios que se producen son evidentes una vez que se supera la talla de madurez sexual, 35 mm según Aguirre, (1979), o 40-50 mm según Figueras (1989). En la costa vasca el índice de condición muestra una variabilidad estacional (Azpeitia *et al.*, 2016), de manera que, tras la puesta, en otoño e invierno el contenido en carne es bajo. En las zonas de producción acuícola, cuando el índice de condición es bajo el producto se suele desviar hacia la conserva (Tirado y Macías 2006). En general, estas fluctuaciones tienen implicaciones en las estrategias de cultivo, dado que es aconsejable que la cosecha coincida con valores máximos del índice de condición (Okumuş y Stirling, 1998). Mason (1969) estableció que el mejillón es comercializable cuando alcanza un valor de 10 de índice de condición.

Material

- Placas Petri o recipiente de papel de aluminio
- Papel secante
- Bandeja
- Bisturí
- Guantes
- Guante de protección
- Estadillo
- Calibre
- Balanzas (de precisión y granataria)
- Congelador (-20 °C)
- Estufa
- Bolsas de plástico
- Nevera portátil

Obtención de muestras

Para determinar el índice de condición de los mejillones se recomienda coger, al menos, 10 individuos. Inmediatamente tras el muestreo, los mejillones se introducen en bolsas de plástico etiquetadas y se transportan al laboratorio en una nevera portátil. Hay que evitar que los mejillones se sometan a estrés o cambios bruscos de temperatura, ya que se puede inducir la puesta (Zorita *et al.,* 2006), pudiendo repercutir en los valores del índice de condición. Al llegar al laboratorio, si las muestras no se procesan directamente, se congelarán a -20ºC.

Procedimiento

Descongelación de las muestras: Antes de pesar y medir los mejillones, éstos se deben descongelar a temperatura ambiente al menos durante 2 h.

Mediciones biométricas: Una vez que los mejillones se hayan descongelado, se procede a obtener las medidas biométricas de la concha. Para ello hay que medir la largura, anchura y altura o grosor máximo del mejillón, con la ayuda de un calibre (Figura 9). Posteriormente, se pesa cada mejillón individualmente.

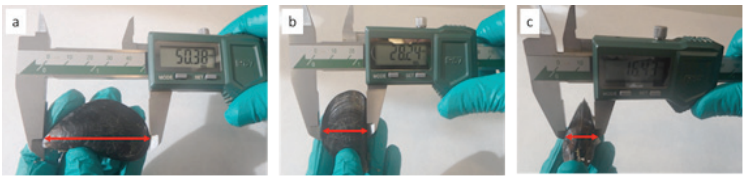

Figura 9. Medición de la concha de un mejillón con el calibre. (a) largura o longitud, (b) anchura y (c) altura o grosor.

Separación de la carne de la concha: Se abre el mejillón con la ayuda de un bisturí y, una vez bien abierto, se separa la concha de la carne. Por una parte, se coloca la carne en una placa Petri o en un recipiente de papel de aluminio (previamente numerado y pesado en una balanza de precisión) y, por otra parte, se ponen ambas conchas juntas encima de papel secante en una bandeja (Figura 10). Se irán colocando ordenadamente y marcando el número de individuo para poder identificarlos.

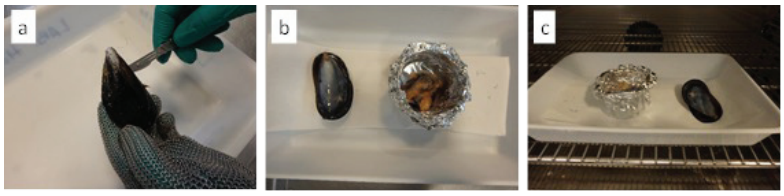

Figura 10. Separación de la carne de la concha. (a) Apertura de un mejillón con un bisturí, (b) colocación de la carne en un recipiente junto con sus dos valvas superpuestas una sobre la otra y (c) secado de la carne y las conchas en la estufa a 55 ºC.

Secado y pesaje del mejillón: La carne y las conchas de mejillón se secan en la estufa a 55ºC durante 48 h y, transcurrido

este tiempo, se vuelven a pesar individualmente en la balanza de precisión, para obtener el peso seco.

Cálculos

Todas las medidas se recogen en un estadillo de laboratorio para determinar el índice de condición (CI) que se calcula según la siguiente fórmula (Freeman, 1974):

$$CI = (DW_m / DW_s) * 100$$

Donde, DW_m es el peso seco de la carne, DW_s es el peso seco de la concha, ambos expresados en gramos (g).

Rendimiento en vianda de mejillón

Contexto

El rendimiento en vianda, o carne de mejillón, es un parámetro clave a la hora de establecer el momento óptimo de cosecha de mejillón y su precio de mercado cuando alcanza talla comercial. El contenido en vianda del mejillón está muy relacionado con la época de reproducción, de tal forma que durante la gametogénesis se incrementa, y en el momento de la puesta se reduce (Irisarri *et al.,* 2015; Álvarez-Salgado *et al*., 2017). Así, Figueras (1989) indica que, en las Rías gallegas, de agosto a diciembre, la condición del mejillón es excelente y el peso de la carne puede alcanzar el 50% del peso total húmedo. Este peso se reduce entre un 40-50% durante la cocción, y se considera que un rendimiento en carne ya cocinada del orden del 20-25% es bueno. El protocolo que aquí se presenta es una adaptación de las "Normas de control de los suministros de mejillón para industria" de la Federación de Asociaciones de Mejilloneros de Arosa y Norte.

Material

- Cepillo, estropajo o cuchillo para limpiar las algas y organismos epibiontes de las conchas
- Calibre
- Balanza
- Hornillo
- Bombona de butano
- Olla a presión de acero inoxidable de 12 l
- Cestillo de acero inoxidable para introducir los mejillones en la olla a presión
- Termómetro
- Reloj cronómetro
- Mechero
- Cuchillo para separar la vianda de las conchas
- Estadillo
- Guantes para limpieza de los mejillones
- Guantes de seguridad para altas temperaturas
- Una probeta de 250 ml
- Una bandeja con vierteaguas
- Dos bandejas para guardar 2 kg de mejillón limpio
- Dos bandejas para pesar las viandas y la concha de mejillón
- Neveras portátiles

Obtención de muestras

Para el muestreo de mejillones destinados a evaluar el rendimiento de vianda es suficiente contar con dos lotes de 2 kg (4 kg en total); sin embargo, se necesitan entre 7 y 10 kg para poder repetir el proceso en caso de que haya algún error. Los mejillones se transportan al laboratorio en neveras portátiles a la mayor brevedad posible. Si los mejillones no se pueden procesar en el momento deben conservarse refrigerados hasta el día siguiente.

Procedimiento

Selección y limpieza de mejillones (Figura 11): con la ayuda de un calibre se seleccionan aproximadamente 5 kg de mejillones con un grosor o altura superior a 17 mm. Se limpian los mejillones utilizando un cepillo, un estropajo o un cuchillo para retirar las algas y otros organismos epibiontes de las conchas. Se descartan los mejillones que estén rotos. A continuación, se lavan los mejillones con agua para arrastrar toda suciedad que hubiera podido quedar y se dejan escurrir. De los mejillones limpios se hacen dos lotes de 2 kg, que se pesan en una balanza, recogiéndose el número de ejemplares y el peso inicial exacto de cada lote. Con cada uno de los lotes se procede de la manera que se describe a continuación.

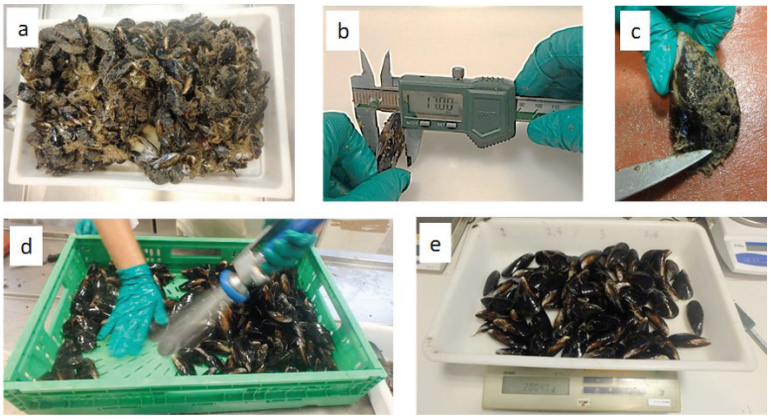

Figura 11. Selección y limpieza de mejillones. a) 7-10 kg de mejillón, b) medición del grosor de la concha de mejillón, c) limpieza y retirada de organismos epibiontes de la concha con la ayuda de un cuchillo, d) lavado de los mejillones con agua de grifo para retirar todas las impurezas de las conchas y e) pesaje de un lote de 2 kg de mejillón limpio escurrido.

Cocción (Figura 12): se lleva el hornillo a una zona ventilada y, a su vez, resguardada de corrientes de aire. Se coloca la bombona de butano en el hornillo. Se enciende el hornillo con un mechero y se pone a la potencia máxima. A continuación, se coloca la olla a presión, vacía, sobre el fuego, se le pone la tapa sin cerrar herméticamente y se precalienta a potencia máxima durante 3 min. Posteriormente se retira la tapa y se vierten 200 ml de agua de grifo a la olla. En cuanto empiece a hervir el agua, se añade la muestra de 2 kg de mejillón dentro del cestillo de acero inoxidable. Se cierra la tapa de la olla y se pone en marcha el cronómetro. Exactamente a los 5 min se corta el gas para apagar el fuego, se levanta la válvula sin quemarse (con guantes de seguridad) y, en cuanto se pueda abrir la olla, se quita la tapa y se introduce un termómetro para medir la temperatura del agua y de la carne de

un mejillón. Se retira el cestillo con los mejillones y se pasa por un chorro de agua fría con el fin de proceder inmediatamente al desconchado (Figura 13). Si tras abrir la olla se aprecia que los mejillones no se han cocido debidamente (están parcialmente cerrados), se debe descartar inmediatamente esa réplica y tomar otra que la sustituya, siempre que sea posible.

Figura 12. Pasos para la cocción de mejillones. a) contar los mejillones que entran en 2 kg, b) precalentar la olla a presión vacía con tapa, c) añadir 200 ml de agua, d) dejar que hierva el agua, e) meter el cestillo con los mejillones dentro de la olla a presión, f) calentar los mejillones a potencia máxima durante 5 min, g) medir la temperatura del agua y de los mejillones cocidos, h) enfriar los mejillones cocidos con agua de grifo.

Desconchado y pesaje de las viandas (Figura 13): tras enfriar y escurrir los mejillones, se separa la vianda de la concha colocando las conchas y las viandas en dos bandejas diferentes para poder pesarlas por separado. Se recoge también cualquier resto de músculo o vianda que hubiera quedado pegado en la concha. Si la carne presenta restos de barbas o biso (filamentos que unen el mejillón al sustrato), se deben retirar y se introducen en la bandeja junto con las conchas. A continuación, se pesa el contenido de ambas bandejas y se apunta el peso en un estadillo. Finalmente, se verifica que el número de viandas corresponde al número de ejemplares previamente contabilizados.

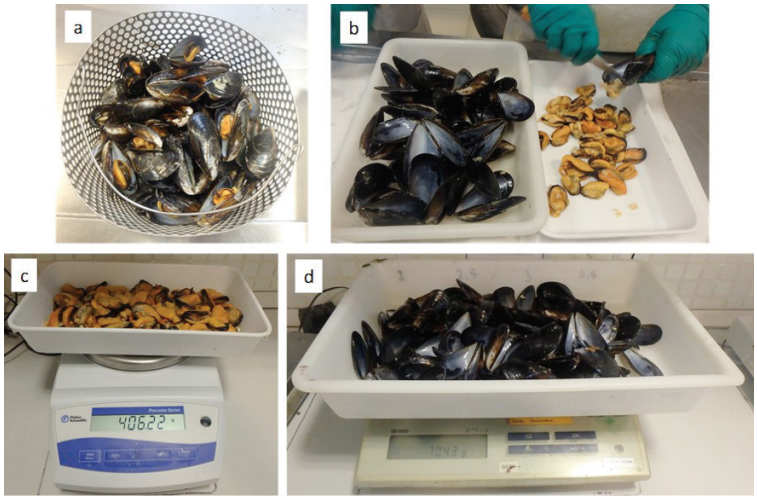

Figura 13. Desconchado y pesaje de las viandas. a) mejillones cocidos, b) separación de la carne de mejillón de las conchas, c) pesaje de la carne y restos de músculo de mejillón y d) pesaje de las conchas y barbas de mejillón.

Cálculos

Cálculo del rendimiento. Tras la cocción de las muestras se obtienen, para cada lote de 2 kg iniciales, los dos parámetros necesarios para el cálculo del rendimiento, que son: el peso vivo inicial (FW_i) y el peso de la vianda cocida (BW_m). El rendimiento se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$MY\ (\%) = (BW_m / FW_i) * 100$$

Donde, MY es el rendimiento, BW_m es el peso de la vianda cocida y FW_i es el peso vivo inicial, ambos expresados en gramos (g).

El valor final del rendimiento es la media de los rendimientos de los dos lotes. El valor obtenido se redondea al número entero o al número medio entre dos enteros más cercano. Por ejemplo, si el resultado fuera de 19,87% se redondearía a 20% y si fuera de 20,35% se redondearía a 20,5%. Cuando la diferencia en el rendimiento de las dos cocciones de 2 kg de mejillón es superior a dos puntos porcentuales (40 g), en el procedimiento de evaluación para la compra-venta se suele solicitar la realización de una tercera cocción. Si en el laboratorio ocurre lo mismo, se puede realizar una tercera réplica, tal y como se haría en el proceso de compra-venta. En este caso, las medias para el cálculo del rendimiento se realizarían con los resultados de las tres cocciones.

Cálculo del número de viandas por kg de vianda. El número de viandas por kg de vianda se calcula multiplicando por 1.000 el número de viandas y dividiendo el resultado por el peso de las viandas en gramos.

$$Nº\ de\ viandas\ por\ kg\ de\ vianda = 1.000 * (Nº_m / BW_m)$$

Donde, $Nº_m$ es el número de viandas y BW_m es el peso de las viandas cocidas (g).

Todos los datos que se vayan obteniendo durante el proceso deben recogerse en un estadillo para facilitar el tratamiento de datos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Viceconsejería de Agricultura, Pesca y Política Alimentaria del Departamento de Desarrollo Económico e Infraestructuras del Gobierno Vasco a través del proyecto IM-17-MUSSELS. Los autores agradecen a Ramón Franco y a José Ramón Gonzáles Boo sus comentarios sobre el cálculo del rendimiento de vianda de mejillón utilizado por la Federación de Asociaciones de Mejilloneros de Arosa y Norte. Asimismo, los autores también están agradecidos a los investigadores del CSIC y de CETMAR de Vigo, Jose Babarro y Laura Peteiro, respectivamente, por sus explicaciones sobre el asentamiento y reclutamiento de la semilla de mejillón. Es de agradecer también la labor del personal de AZTI en la confección de tamices y jarras. Los comentarios de Ainhoa Arévalo y de Javier Franco han ayudado a mejorar considerablemente la primera versión de este manuscrito. Esta es la contribución número 905 de la Unidad de Investigación Marina de AZTI.

Referencias

Aguirre, M.P., 1979. Biología del mejillón (*M. edulis*) de cultivo de la Ría de Vigo. *Boletín del Instituto Español Oceanográfico*, 5:109-159.

Álvarez-Salgado X.A., U. Labarta, V. Vinseiro, M.J. Fernández-Reiriz, 2017. Environmental drivers of mussels flesh yield in a coastal upwelling system. *Ecological Indicators,* 79: 323-329.

Azpeitia, K., L. Ferrer, M. Revilla, J. Pagaldai, D. Mendiola D., 2016. Growth, biochemical profile, and fatty acid composition of mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) cultured in the open ocean of the Bay of Biscay (northern Spain). *Aquaculture,* 454: 95-108.

Azpeitia K., M. Ortiz-Zarragoitia, M. Revilla, D. Mendiola, 2017. Variability of the reproductive cycle in estuarine and coastal populations of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. from the SE Bay of Biscay (Basque Country). *International Aquatic Research*, 9:329–350.

Bayne, B.L., 1976. Marine mussels: their ecology and physiology, vol 10. Cambridge University Press, Cambridge.

Beyer, J, N.W. Green, S. Brooks, I.J. Allan, A. Ruus, T. Gomes, I.L.N. Brate, M. SchØyen, 2017. Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Marine Environmental Research,* 130: 338-365.

Blanco-Rayón, E., 2018. Contribution to the development of Best Available Practices (BAPs) for a multi-biomarker approach in sentinel mussels based on a better understanding of the influence of confounding factors on biomarker values and responsiveness. International PhD Thesis, University of the Basque Country, pp. 266.

Boletín Oficial del País Vasco, 2016. Orden de 8 de enero de 2016, de la Consejera de Desarrollo Económico y Competitividad, por la que se declara y clasifica una zona de producción de moluscos bivalvos por medio de cultivos marinos ubicada en el tramo litoral entre Ondarroa y Lekeitio (BOPV Nº 9, del 15 de enero de 2016).

Box, G.E.P., Hunter, W., Hunter, J.S., 1989. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. S.A. Reverté, Barcelona.

Cajaraville, M.P., I. Marigómez, E. Angulo, 1992. Comparative effects of the water accomodated fraction of three Oils on mussels - 1. Survival, growth and gonad development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 102: 103-112.

Choi, K-S, D.H. Lewis, E.N. Powell, S.M. Ray, 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture and Fisheries Management,* 24: 299-322.

da Silva, P.M., J. Fuentes, A. Villalba, 2009. Differences in gametogenic cycle among strains of the European flat oyster *Ostrea edulis* and relationship between gametogenesis and bonamiosis. *Aquaculture,* 287: 253-265.

Figueras, A. J., 1989. Mussel culture in Spain and France. *World Aquaculture*, 20(4):8-17.

Filgueira, R., L-G. Peteiro, U. Labarta, M.J. Fernández-Reiriz., 2007. Assessment of spat collector ropes in Galician mussel farming. *Aquacultural Engineering,* 37: 195–201.

Freeman, K.R., 1974. Growth, mortality and seasonal cycle of *Mytilus edulis* in two Nova Scotian embayments. Technical Report 500. Department of the Environment, Fisheries and Marine Service, Canada, 112 pp.

Fuentes, J., J. Morales, 1994. Settlement of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on collectors suspended from rafts in the Ría de Arousa (NW of Spain): annual pattern and spatial variability. *Aquaculture*, 122: 55–62.

Fuentes-Santos, I., U. Labarta, 2015. Spatial patterns of larval settlement and early post-settlement survivorship in *Mytilus galloprovincialis* in a Galicia Ría (NW Spain). Effect on recruitment success. *Regional Studies in Marine Science*, 2: 1-10.

Gobierno Vasco, 2008. Plan Estratégico de Pesca del País Vasco 2007-2013. Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Gobierno Vasco, 2014. Akuikulturaren Garapenerako Plan Estrategikoa/ Plan Estratégico para el Desarrollo de la Acuicultura 2014-2020. Dirección de Pesca, Acuicultura y Política Alimentaria. 134 pp. (http://www.nasdap.ejgv.euskadi.eus/plan_programa_proyecto/plan-estrategico-para-el-desarrollo-de-la-acuicultura-2014-2020/r50-3812/es/).

González, M., O. Solaun, I. Zorita, M. Revilla, M. Andrés, J. Franco, I. Epelde, P. Liria, J.L. Asensio, J.G. Rodríguez, J. Bald, L.E. Lagos, L. Arantzamendi, J. Larreta, I. Menchaca, A. Borja, V. Valencia, 2017. Sistemas innovadores de monitoreo para prevención de riesgos en zonas de producción de moluscos en mar abierto. Elaborado por AZTI para Gobierno Vasco, Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad, Vice. de Agricultura, Pesca y Políticas Alimentarias, Dirección de Pesca y Acuicultura, Informe final. 192 pp + anexos.

Gosling, E., 2004. Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Fishing News Book.

Irisarri, J., M.J. Fernández-Reiriz, U. Labarta, U., 2015. Temporal and spatial variations in proximate composition and Condition Index of mussels *Mytilus galloprovincialis* cultured in suspension in a shellfish farm. *Aquaculture,* 435: 207–216.

Lucas, A., P. Beninger, 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalvia aquaculture. *Aquaculture*, 44: 187-200.

Mason, J., 1969. Mussel raft trials succeed in Scotland. *World Fisheries*, 18 (4): 22–24.

Mendiola D., M. Andrés, S. Riesco, P. Liria, M. González, 2011a. Análisis conceptual de la viabilidad socioeconómica del uso de sistemas longline para el engorde sumergido de moluscos bivalvos en el mar abierto del País Vasco. Actas del XIII Congreso Nacional de Acuicultura, Sesión Economía. (ISBN: 978-84-937611-0-3). Castelldefels, Barcelona, Spain 2011.

Mendiola D., M. Andrés, S. Riesco, I. Galparsoro, M. González, P. Liria, C. Hernández, 2011b. Estudio de Viabilidad Técnica sobre el uso de longlines sumergidos para el engorde en mar abierto de moluscos bivalvos: mejillón (*Mytilus* sp.), ostra (*O. edulis* ó *C. gigas*), y/o almeja fina (*Ruditapes* sp.), como actividad de diversificación para el sector pesquero del País Vasco. Informe final. Inédito. 158 pp + anexos.

Mendiola D., M. González, J. Bald, P. Liria, C. Hernández, L. Ferrer, A. del Campo, I. Mentxaka, M. Revilla, J. Franco, 2012. Prueba piloto para la demostración del cultivo de mejillón en mar abierto por medio de sistemas de líneas de cabos tipo LONGLINE sumergido. Informe final. 92 pp + anexos.

Mendiola D., M. Revilla, M. González, O. Solaun, M. Andrés, I. Mentxaka, J. Bald, I. Epelde, P. Liria, I. Martin, I. Muxika, 2015. Viabilidad del engorde de ostra en mar abierto, como actividad diversificadora de actividades marinas en Euskadi. Informe final. 144 pp + anexos.

Mondol, M.R., C-W. Kim, C-K. Kang, S.R. Park, R.G. Noseworthy, K-S, Choi, 2016. Growth and reproduction of early grow-out hardened juvenile Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay, off the south coast of Korea. *Aquaculture,* 463: 224-233.

Okumuş, I., H.P. Stirling, 1998. Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture*, 159 (3–4): 249–261.

Pérez-Camacho, A., U. Labarta, 2004. Rendimientos y producción del mejillón: bases biológicas para la innovación. En: Labarta, U., M.J. Fernández-Reiriz,, A. Pérez-Camacho, E. Pérez-Corbacho (Eds.), Bateeiros, mar, mejillón. Una perspectiva bioeconómica. Editorial Galaxia, Vigo, pp. 97–125.

Pérez-Camacho, A., U., Labarta, R. Beiras, 1995. Growth of mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis*) on cultivation rafts: influence of seed source, cultivation site and phytoplankton availability. *Aquaculture*, 138: 349–362.

Peteiro, L.G, U. Labarta, M.J. Fernández-Reiriz, X.A. Alvarez-Salgado, R. Filgueira, S. Piedracoba, 2011. Influence of intermittent-upwelling on *Mytilus galloprovincialis* settlement patterns in the Ria de Ares-Betanzos. *Marine Ecology Progress Series,* 443: 111-127.

Seed, R., 1969. The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. *Oecologia,* 3: 277- 315.

Sprung, M., 1991. Costs of reproduction: a study on metabolic requirements of the gonads and fecundity of the bivalve *Dreissena polymorpha*. *Malacologia,* 33:63-70.

Tirado, C., J.C. Macias, 2006. Cultivo de mejillón: Aspectos generales y experiencias en Andalucía. Dirección General de Pesca y Acuicultura. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, pp. 174.

Zorita, I., M. Ortiz-Zarragoitia, M. Soto, M.P. Cajaraville, 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquatic Toxicology*, 78: 109-116.

Anexos

Anexo I. Estadillo para evaluar el desarrollo gametogénico de mejillones.

INFORME DE LABORATORIO: DETERMINACIÓN DESARROLLO GAMETOGÉNICO											
PROYECTO							RESP. PROYECTO:				FIN ANALÍTICA:
CÓDIGO ENTRADA	FECHA ENTRADA	CÓDIGO LAB	CODIGO CLIENTE	FECHA MUESTREO	ANALISTA	FECHA ANÁLISIS	Identificación muestra	Sexo	Fase de desarrollo	GI	Observaciones

Anexo II. Estadillo para determinar el asentamiento y el reclutamiento de mejillones.

INFORME DE LABORATORIO: PROCESADO CUERDAS CAPTACIÓN (recuento manual)														
PROYECTO							RESP. PROYECTO:					FIN ANALÍTICA:		
CÓDIGO ENTRADA	FECHA ENTRADA	CÓDIGO LAB	CODIGO CLIENTE	FECHA MUESTREO	ANALISTA	FECHA ANÁLISIS	Longitud Muestra-Cuerda (cm)	Nº INDIV 20mm	Nº INDIV 15mm	Nº INDIV 10mm	Nº INDIV 5mm	Nº INDIV 2400µm	Nº INDIV 1000µm	OBSER-VACIONES

Anexo III. Estadillo para obtener el índice de condición de mejillones.

INFORME DE LABORATORIO: ÍNDICE DE CONDICIÓN																
PROYECTO							RESP. PROYECTO:					FIN ANALÍTICA:				
CÓDIGO ENTRADA	FECHA ENTRADA	CÓDIGO LAB	CODIGO CLIENTE	FECHA MUESTREO	ANALISTA	FECHA ANÁLISIS	Nº ind	Longitud máx (mm)	Anchura máx (mm)	Altura máx (mm)	Peso fresco (g)	Peso concha seca (g)	Nº placa	Peso placa vacía (g)	Peso placa + carne seca (g)	IC

Anexo IV. Estadillo para el cálculo del rendimiento en carne de mejillón.

INFORME DE LABORATORIO: RENDIMIENTO EN CARNE														
PROYECTO							RESP. PROYECTO:					FIN ANALÍTICA:		
CÓDIGO ENTRADA	FECHA ENTRADA	CÓDIGO LAB	CODIGO CLIENTE	FECHA MUESTREO	ANALISTA	FECHA ANÁLISIS	Muestra /lote	Peso vivo inicial (g)	Número de mejillones en 2 kg	Peso de la vianda (g) en 2 kg	Peso del resto (concha + biso) (g) en 2 kg	Rendimiento (%)	Número de viandas por kg de viandas	Observaciones

DERIO

Astondo Bidea, Edificio 609
Parque Tecnológico de Bizkaia
48160 - Derio (Bizkaia)

SUKARRIETA

Txatxarramendi ugartea z/g
48395 - Sukarrieta (Bizkaia)

PASAIA

Herrera Kaia, Portualdea z/g
20110 - Pasaia (Gipuzkoa)

azti tecnalia